

博士論文（要約）

**Ultrastructural analyses of influenza virus-infected mouse
lung to understand the pathogenesis of
influenza virus-induced pneumonia**

（インフルエンザウイルス性肺炎の病態に関する
超微細構造解析）

仲尾 （多田） 朋美

論文題目 Ultrastructural analyses of influenza virus-infected mouse lung to understand the pathogenesis of influenza virus-induced pneumonia

(インフルエンザウイルス性肺炎の病態に関する超微細構造解析)

氏名 仲尾 (多田) 朋美

【背景及び目的】

冬季に流行する急性呼吸器感染症の原因ウイルスである A 型インフルエンザウイルスは、ヒトの上気道に限局して感染する。しかし、2009 年のパンデミック H1N1 ウイルスは、肺などの下気道にも感染して急性ウイルス性肺炎を引き起こすことがある。また、H5N1 や H7N9 といった鳥インフルエンザウイルスに感染した患者の多くは、ウイルス性肺炎による重篤な呼吸器症状を呈する。重篤なウイルス性肺炎を呈した患者には抗インフルエンザ薬の投与に加えて、呼吸器症状や全身症状に応じた対処療法が行われるが、有効な治療法は確立していないのが現状である。

ウイルス性肺炎を呈した 2009 年パンデミックインフルエンザ患者や鳥インフルエンザ患者の肺組織を免疫学のおよび病理組織学的手法で解析すると、感染局所に浸潤した多数の好中球が観察される。免疫応答の最初の段階で動員される好中球は、サイトカイン・ケモカイン産生、活性酸素種の産生、プロテアーゼ分泌、貪食、好中球細胞外トラップ (neutrophil extracellular traps ; NETs) 放出などにより病原体を排除する。インフルエンザウイルス感染マウスモデルを用いた先行研究では、マウスから好中球を除去するとウイルスの増殖が促進され、マウスが重症化することが示された。このことはインフルエンザウイルス感染に対する生体防御において好中球が重要な役割を担っていることを示唆している。一方で、好中球から産生される種々の生理活性物質は正常な組織も傷害するため、その過剰な浸潤は肺炎重症化の一因となっている。このように、好中球はインフルエンザウイルス性肺炎の病態形成に関与していることが示されている。したがって、インフルエンザウイルス感染における好中球の役割に関する理解が深まれば、重度のウイルス性肺炎を呈した患者に対する新たな治療法の開発に繋がることが期待される。

好中球は、貪食や NETs 形成などにより病原体を排除する際、その形態を大きく変化させる。従来病理組織学的手法では、炎症部位に浸潤した免疫細胞の種類や分布を組織・細胞レベルで解析することはできるが、個々の細胞に起きる微細な形態変化を捉えることはできない。そこで本研究では、インフルエンザウイルス性肺炎の病態形成を理解することを目的として、インフルエンザウイルス感染マウス肺に浸潤した好中球の分布、超微形態の変化、および他の細胞との相互作用等を、電子顕微鏡を用いて解析した。

【方法、結果及び考察】

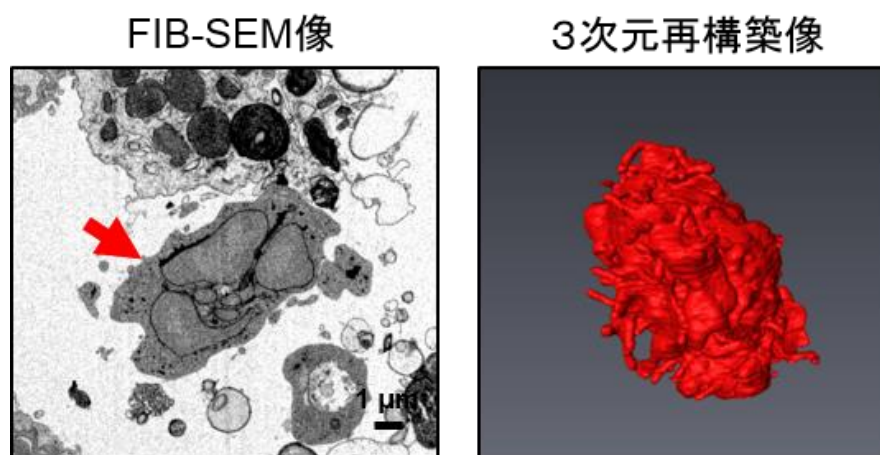
インフルエンザウイルス性肺炎の病態形成における好中球の役割の一端を明らかにする

ために、感染マウスの肺胞領域に浸潤した好中球の形態を集束イオンビーム走査型電子顕微鏡 (Focused ion beam-scanning electron microscope ; FIB-SEM) を用いて解析した。インフルエンザウイルスは、蛍光タンパク質 Venus の遺伝子を組み込んだ A/Puerto Rico/8/34(H1N1) のマウス馴化株 (MA-Venus-PR8) を用いた。C57BL/6J マウスに MA-Venus-PR8 株を経鼻接種し、感染後 4 日目に肺を採材した。肺組織内の好中球を FIB-SEM で撮影し、個々の細胞について 3 次元再構築を行ない、その表面構造を観察した。毛細血管内の好中球の表面は、ほぼ平滑であったのに対して、肺胞内に浸潤した一部の好中球の表面には多数の触手様構造 (図 1) が認められた。また、I 型あるいは II 型肺胞上皮細胞、単球や死細胞に接着した好中球、さらには好中球同士の接着が観察された。

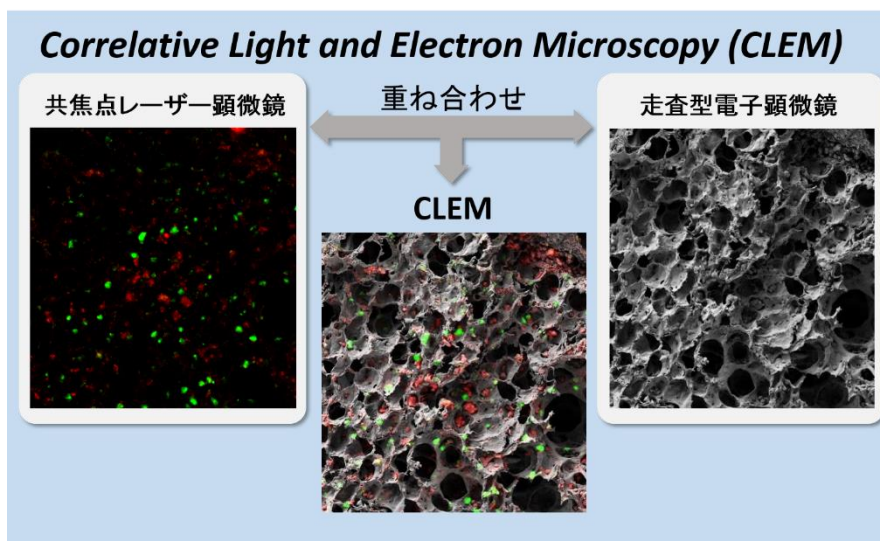
ヒトの好中球はインフルエンザウイルスを感染させた培養細胞に接着することが報告されている。マウスの好中球もインフルエンザウイルス感染肺胞上皮細胞に接着するのかどうかを確認するために、*in vitro* の共培養実験を行った。好中球はカゼインを注入したマウス腹腔から腹腔液を採取し、Percoll 法で分離した。比較対照として、マウス脾臓から分離した単球を用いた。マウス肺胞上皮由来細胞株 (MLE-12) に A/WSN/33 (H1N1; WSN) を multiplicity of infection (MOI) = 10 にて感染させ、感染 6 時間後に好中球または単球を添加して 4 時間共培養した。感染細胞を洗浄した後、同細胞に接着した好中球または単球を蛍光抗体法で検出した。その結果、感染細胞に接着した好中球の数は、非感染細胞に接着したそれよりも有意に多いことがわかった。次に、生体内においても同様に好中球がインフルエンザウイルス感染細胞に結合するのかどうかを光子・電子相関顕微鏡 (Correlative light and electron microscopy ; CLEM) 法 (図 2) を用いて解析した。マウスに MA-Venus-PR8 株を経鼻接種し、感染後 2 日目と 4 日目に肺を採材して、Ly6G に対する抗体で蛍光免疫染色した。肺組織内の Venus 陽性細胞 (感染細胞) と Ly6G 陽性細胞 (好中球) を共焦点レーザー顕微鏡で検出した後、同一視野に存在するそれぞれの細胞の形態を走査型電子顕微鏡で観察した。共焦点レーザー顕微鏡で感染マウス肺を観察したところ、感染後 2 日目では感染細胞と好中球は細気管支とその周囲に限局していた。一方、感染後 4 日目では多数の感染細胞と好中球が肺胞領域で検出され、一部の好中球は感染細胞に隣接して存在していた。この隣接部位を走査型電子顕微鏡にて観察したところ、感染細胞を覆うように接着している好中球や、感染細胞を貪食するように接着している好中球が見られた (図 3)。この好中球が接着した感染細胞表面には、多数のウイルス様粒子が認められた。好中球の感染細胞への接着がウイルス感染肺において、どの程度の頻度で起きているのかを調べた。マウスに MA-Venus-PR8 株を経鼻接種し、感染後 4 日目に肺を採材した。Venus 陽性細胞と Ly6G 陽性細胞を共焦点レーザー顕微鏡で撮影し、その Z スタック像からそれぞれの細胞の 3 次元像を構築した。その結果、肺胞領域内の広範囲にわたって、好中球が感染細胞に近接している様子が多数観察された。

インフルエンザウイルス感染マウスの肺組織内の好中球を超微形態学的に解析したところ、細胞表面の形態は個々の好中球間で大きく異なることがわかった。この形態変化は肺胞

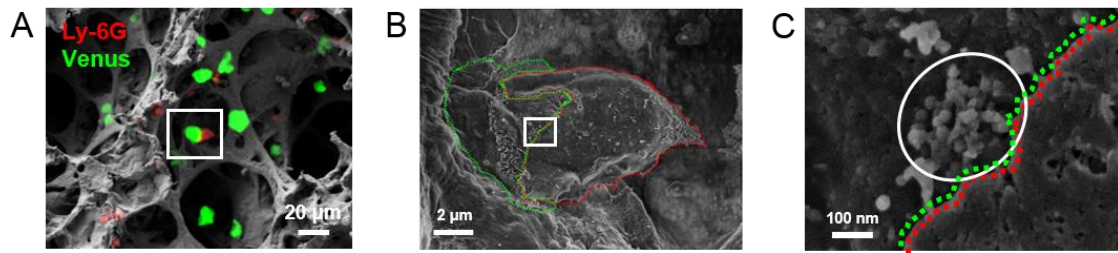
内における好中球の遊走や貪食活性に関与している可能性が示唆された。また、肺胞内に浸潤した好中球は様々な種類の細胞と相互作用していることが示唆された。さらに、肺胞内に浸潤した好中球は感染細胞に直接接着することが本研究によって初めて明らかにされた。以上の成績は、好中球のウイルス感染細胞への接着が生体防御において重要な役割を担っている可能性を示唆している。本研究の成果を応用することで、正常肺組織の傷害を減らしつつ、好中球の抗ウイルス効果を促進する新規治療法開発に繋がることが期待される。



[図1] FIB-SEMで撮影したインフルエンザウイルス感染マウス肺組織：肺胞内に浸潤した好中球のFIB-SEM像（左図、矢印）とその3次元再構築像（右図）を示す。好中球の表面には多数の触手様構造が認められた。



[図2] 本研究で使用した CLEM 法の概要：同一箇所を共焦点レーザー顕微鏡と走査型電子顕微鏡で観察し、それぞれの観察画像を重ね合わせた。



[図3] CLEM法を用いて撮影したインフルエンザウイルス感染マウス肺組織：(A) 好中球（赤）と感染細胞（緑）のCLEM画像。(B) (A)の白枠の拡大図を示す。感染細胞に接着した好中球が観察された。(C) (B)の白枠の拡大図を示す。好中球が接着した感染細胞表面には多数のウイルス様粒子が認められた。